

2/PRTS

09/701203  
529 Rec'd PCT/PTC 27 NOV 2000

14665/PCT Hz/Ri

Verfahren und Vorrichtung zum Prozessieren  
von Kleinstsubstanzenmengen

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Prozessieren von Kleinstsubstanzenmengen im Reservoir einer Fluid-Dosiereinrichtung, insbesondere ein Verfahren zum Sammeln, Reinigen und/oder Aufkonzentrieren von Substanzproben in kapillarförmigen Behältern, z.B. in Mikropipetten oder Mikrodispensern, und Vorrichtungen zur Realisierung der Verfahren.

Im Bereich der Biochemie, Gentechnik und Medizin werden kleinste Probenmengen gewonnen, nachgewiesen, analysiert, be- oder verarbeitet. Dabei besteht häufig die Aufgabe, die in einer Flüssigkeit gelösten oder suspendierten Proben zwischen makroskopischen Behältnissen wie z.B. Mikrotiterplatten ( $\mu$ l-Volumina) und miniaturisierten Trägern wie z.B. Membranen, Filtern, MALDI-MS-Targets, Silizium-Wafern oder Nanotiterplatten (nl-Volumina) zu transferieren. Als Werkzeuge zur Übertragung geringster Substanzenmengen (Untergrenze rd. 1/10 nl) sind sogenannte "Pin-Tools", bei denen die zu transferierenden Proben an Nadelspitzen anhaften, oder Mikropipetten oder Mikrodispenser bekannt, bei denen analog zur Tintenstrahldrucktechnik kleinste Tropfen mit der inkorporierten Probe auf dem jeweiligen Ziel-Substrat plaziert werden. Bei der Übertragung an der Schnittstelle zwischen makroskopischen Behältnissen und miniaturisierten Trägern besteht generell das Problem, daß durch die Verwendung eines Teils der im makroskopischen Behältnis vorliegenden Probenmenge nach der Übertragung auf den miniaturisierten Träger zu wenig Substanz vorhanden ist, um einen zuverlässigen Analyse- oder Bearbeitungsvorgang anzuschließen. Daher besteht ein Interesse daran, Substanzenmengen in kleinen Volumina ( $\mu$ l-Bereich) aufzukonzentrieren, zu sammeln und/oder zu reinigen.

Beim Nachweis der interessierenden Substanzen erreichen massenspektrometrische Verfahren heute Nachweisempfindlichkeiten im Attomol- bis unteren Femtomol-Bereich. Diese Empfindlichkeit kann in der Praxis effektiv nur dann genutzt werden, wenn der Analyt in möglichst reiner Form in einem nur wenige Nanoliter umfassenden Volumen vorliegt. Auch hierfür besteht ein Interesse an einer Aufreinigung oder Anreicherung von Substanzproben.

Aus der chemischen und biochemischen Analytik ist allgemein bekannt, zur Probenanreicherung in die jeweilige Lösung oder Suspension Festphasen einzubringen, an denen die gewünschten Moleküle vorübergehend gebunden werden. Bei geeigneten magnetischen Materialeigenschaften können die Festphasen unter Wirkung magnetischer Feldkräfte manipuliert werden (magnetische Aufreinigung).

Aus US-A-5 186 872 ist eine magnetische Trenneinrichtung zur Trennung magnetischer Teilchen von einem nicht-magnetischen Testmedium bekannt. Die magnetischen Teilchen sind kleine Partikel, auf deren Oberflächen die interessierenden Substanzen gebunden sind, oder beispielsweise biologische Zellen, in die magnetische Substanzen inkorporiert sind. Mit einer Vielzahl von Magneten wird im Testmedium ein magnetischer Feldgradient derart aufgebaut, daß die magnetischen Teilchen an die Gefäßwandung bewegt und dort gesammelt werden. Die aus US-A-5 186 872 bekannte magnetische Trenneinrichtung besitzt die folgenden Nachteile.

Die Trenneinrichtung besitzt einen komplexen Aufbau. Zur Ausbildung der Feldgradienten müssen mindestens vier Magneten vorhanden sein, die in vorbestimmter Weise angeordnet sind und die Verwendung bestimmter Behältnisse für das Testmedium erfordern. Die für charakteristische Behältnis-Dimensionen im

cm-Bereich konzipierte herkömmliche Trenneinrichtung erlaubt, insbesondere beim Einsatz von Elektromagneten, keine Miniaturisierung. Damit ist ein Einsatz an der oben genannten Schnittstelle zwischen makroskopischen Behältnissen und Miniaturträgern bei den verwendeten Werkzeugen ausgeschlossen. Schließlich ist die herkömmliche Trenneinrichtung auf den reinen Trennvorgang beschränkt. Die Beladung magnetischer Teilchen mit den interessierenden Substanzen in der Trenneinrichtung ist nicht vorgesehen.

Aus US-A-5 498 550 ist ein Probensammler bekannt, bei dem Komplexe aus Proteinproben und magnetisch markierten Antikörpern unter der Wirkung eines externen Magnetfeldes in einem Reaktor manipuliert werden. Dieser Probensammler ist jedoch nicht für die Handhabung von Substanzmengen mit Volumina im nl- bis  $\mu$ l-Bereich geeignet. Ein weiterer Nachteil besteht in der Einschränkung auf bestimmte Substanzen, die die jeweilige Antigen-Antikörper-Reaktion zur Komplexbildung eingehen. Des weiteren ist aus WO 97/44671 und JP 08/062224 (in: Patent Abstracts of Japan, 1996) ein System zur Steuerung magnetischer Partikel in Pipettieranordnungen bekannt. Die magnetischen Partikel befinden sich suspendiert in einer pipettenförmigen Küvette und können mit einem äußeren Permanentmagneten an den Küvettenrand gezogen werden. Bei Entfernung des Permanentmagneten werden die Partikel freigegeben und können dadurch zum unten offenen Ende der Küvette sinken. Auch dieses System ist auf die Manipulierung größerer Probenvolumina im ml-Bereich beschränkt. Des weiteren besteht ein Nachteil dahingehend, daß die Partikelsteuerung lediglich die Bindung oder Freigabe, jedoch nicht eine gezielte Bewegung der Partikel in der Küvette umfaßt. Eine magnetische Trenneinrichtung wird in WO 96/09550 (bzw. US-A-5 567 326) beschrieben, in der magnetisierbare Partikel aus einem nicht-magnetischen Testmedium extrahiert werden. Das Testmedium ist in einer Küvettenanordnung untergebracht, bei der jede Küvette zum Ein-

tauchen eines stiftförmigen Permanentmagneten eingerichtet ist. Der Nachteil dieser Technik besteht darin, daß die Küvetten kein Dispersieren des Testmediums erlauben und damit das Testmedium nur schwer handhabbar ist.

Weitere Systeme zur Manipulierung magnetischer oder magnetisierbarer Partikel sind aus WO 86/06493, WO 89/01161, US-A-5 147 529 und US-A-3 985 649 bekannt. All diese Systeme erlauben jedoch keine Medienabgabe nach Art eines Dispensers. Diese Dispensierfunktion ist jedoch gerade in Zusammenhang mit den eingangs genannten Aufgaben in der Biochemie, Gentechnik und Medizin von entscheidender Bedeutung.

Gegenwärtig ist keine Aufreinigungs- oder Anreicherungstechnik bekannt, die zur Prozessierung (z. B. Handhabung, Sammlung, Reinigung oder dergl.) kleinster Substanzmengen (bis zum nl-Bereich und darunter) einsetzbar ist.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum Prozessieren kleinster Substanzmengen anzugeben, das insbesondere mit dem Einsatz herkömmlicher Werkzeuge zur Probenhandhabung im nl-Bereich kompatibel ist und einen möglichst breiten Einsatzbereich besitzt. Das Verfahren soll einfach in die üblichen Methoden zur Probenhandhabung, zum Probennachweis und zur Probearbeitung aus der Biochemie, Gentechnik und Medizin integrierbar sein. Die Aufgabe der Erfindung besteht auch darin, eine Vorrichtung zur Implementierung eines derartigen Verfahrens anzugeben.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren oder Vorrichtungen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 11 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Sammlung von Substanzproben basiert auf der Anordnung und Bewegung einer Festphase (Trägermaterial) unmittelbar im Reservoir einer Mikrodosiereinrichtung, wobei die interessierende Substanz auf der Oberfläche des Trägermaterials gebunden und für eine vorbestimmte Folge von Arbeitsschritten im Reservoir gehalten wird. Das Reservoir besitzt ein charakteristisches Volumen, das allgemein kleiner als 500  $\mu\text{l}$  ist und vorzugsweise weniger als 10  $\mu\text{l}$ , insbesondere weniger als 2  $\mu\text{l}$ , bis zu 1 nl, beträgt. Die Dosiereinrichtung ist zur Mikrotropfenabgabe im Sub-nl-Bereich ausgelegt. Das Trägermaterial kann durch magnetische Partikel, die durch eine äußere magnetische Feldkraft bewegt werden, oder durch einen porösen Trägerballen gebildet werden, der durch eine äußere mechanische Betätigung bewegt wird. Das Trägermaterial besteht aus einem an sich inkompressiblen und harten Material. Dies bedeutet, daß das Trägermaterial bei Betätigung der Dosiereinrichtung, z.B. durch Anlegen eines Druckpulses, keine Formänderung eingeht.

Die Bindung zwischen der oder den interessierenden Substanzen und der Oberfläche des Trägermaterials erfolgt über die Ausbildung von van-der-Vaals-Kräften aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen. Dies bedeutet, daß die Bindung mit einer relativ geringen Spezifität hinsichtlich des einzelnen Stoffes erfolgt und damit die Erfindung mit ganzen Substanzklassen in Stoffgemischen (z.B. Gemische von Peptiden, Proteine, DNA oder Oligonukleotide) realisiert werden kann.

Mit dem Begriff "Reservoir" der Dosiereinrichtung wird hier das aktive Dosiervolumen oder Hubvolumen oder - bei Implementierung mit entsprechenden Einrichtungen - das Pipettenvolumen oder das Dispenservolumen bezeichnet. Die Dosiereinrichtung kann durch jede geeignete Pump- oder Dosiereinrichtung gebildet werden, die zur Abgabe vorbestimmter Fluidmengen vom Reservoir auf ein Zielsubstrat eingerichtet ist. Die Erfindung

wird vorzugsweise mit Dosiereinrichtungen für kleinste Substanzmengen (Nanoliter und Sub-Nanoliter) realisiert. Hierzu zählen beispielsweise Mikropipetten oder Mikrodispenser oder Mikropumpen (insbesondere mit pneumatischem oder elektrischem Antrieb) oder andere Mikrotropfenschußeinrichtungen, die analog zu den Tintenstrahltechniken funktionieren.

Zur Prozessierung kleinster Substanzmengen wird das Trägermaterial vorzugsweise in unmittelbarer Nähe einer Austrittsöffnung des Reservoirs der Dosiereinrichtung angeordnet bzw. bewegt. Dies bedeutet beispielsweise eine Manipulierung des Trägermaterials an oder nahe der Spitze einer Dosierkapillare z.B. eines Mikrodispensers. Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht in deren Kompatibilität mit beliebigen, herkömmlichen Dosiereinrichtungen. Es wurde erstmalig festgestellt, daß eine Probensammlung nach dem Prinzip der an sich bekannten Festphasen-Aufreinigung in Dosiereinrichtungen möglich ist, ohne deren Funktion zu beeinträchtigen. Dies betrifft insbesondere die Implementierung der Erfindung in Mikrodosiereinrichtungen mit nl-Volumina.

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung zeichnet sich dadurch aus, daß im Reservoir einer Fluid-Dosiereinrichtung ein Trägermittel als Festphase mit bindungsaktiver Oberfläche angeordnet und mit einer äußeren Antriebseinrichtung manipulierbar ist. Vorzugsweise werden eine Vielzahl von Fluid-Dosiereinrichtungen parallel betrieben, wobei nur eine gemeinsame Antriebseinrichtung zur Manipulierung der Festphasen vorgesehen ist.

Die Erfindung besitzt den Vorteil, daß erstmalig das Problem der miniaturisierten Proben-Aufreinigung oder -Sammlung gelöst wird. Die Erfindung ist einfach mit verfügbaren Mikropipetten oder Mikrodispensern, insbesondere bei deren einzelner oder

seriellem Einsatz, ohne Störung herkömmlicher Verfahrensabläufe realisierbar. Es ist erstmalig gelungen, in Mikrodispensern Probensubstanzen an einem Trägermaterial zu binden und mit diesem im Mikrodispenser zu bewegen, ohne die Funktion des Mikrodispensers einzuschränken. Dies stellt einen unerwarteten und wesentlichen Erfolg dar, da normalerweise z.B. piezoelektrische Mikrodispenser einen Funktionsausfall zeigen, wenn sich in ihrem Inneren ein kompressibler Bestandteil, z.B. auf der Basis von Partikeln, suspendierten Flüssigkeiten oder Gaseinschlüssen, befindet. Es hat sich gezeigt, daß bei Verwendung von magnetischen Partikeln als Trägermaterial, die einen charakteristische Größe im Bereich von 200 nm bis 1  $\mu$ m besitzen, in vorteilhafter Weise eine Doppelfunktion erfüllt wird. Einerseits besitzen sie eine sehr große affine Oberfläche zur Bindung der Probensubstanzen. Andererseits wird durch die kleinen Partikel der Dispensiervorgang nicht gestört, wobei insbesondere auch ein Verstopfen der Austrittsdüse ausgeschlossen wird. Die Erfindung erlaubt sowohl die Bindung der interessierenden Substanzen am Trägermaterial als auch dessen Manipulierung innerhalb eines Behältnisses des Reservoirs ohne Zusatzschritte. Diese Manipulierung umfaßt insbesondere eine Elution der am Trägermaterial phasengebundenen Substanzen.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung betrifft den Einsatz bei Mikropipetten oder Mikrodispensern. Für das reproduzierbare, genaue Dispensieren kleinster Flüssigkeitsmengen müssen nämlich die geometrischen Eigenschaften der Dispenserspitze sowie die elektrischen Piezoparameter optimal aufeinander abgestimmt sein. Die Erfindung ermöglicht es, daß das für eine vorübergehende Anbindung der Moleküle erforderliche feste Trägermaterial den Dispersiervorgang nicht stört, d.h. weder die Gefäßdimensionen noch die durch die Flüssigkeit laufende Druckwelle effektiv beeinflußt werden.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beiliegenden Zeichnungen beschrieben:

- Fig. 1: eine schematische Illustration einer ersten Ausführungsform der Erfindung, bei der ein magnetisches Trägermaterial in einer Dosiereinrichtung verwendet wird,
- Fig. 2: eine schematische Illustration einer zweiten Ausführungsform der Erfindung bei der ein poröser Trägerballen in einer Dosiereinrichtung verwendet wird,
- Fig. 3: eine schematische Draufsicht auf eine erfindungsgemäße Vorrichtung mit einer Reihe von Mikrodispensern, die jeweils zur Realisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingerichtet sind, und
- Fig. 4: eine schematische Seitenansicht der Vorrichtung gemäß Fig. 3.

Die Erfindung wird vorzugsweise mit Dosiereinrichtungen realisiert, die für eine Abgabe von Flüssigkeitsmengen im nl- bis  $\mu$ l-Bereich eingerichtet sind. Dies bedeutet, daß die Dosiereinrichtung jeweils ein Dosier-Reservoir im 1/10 nl- bis  $\mu$ l-Bereich besitzt, aus dem, vorzugsweise bei Druckbetätigung, Tropfen oder Portionen mit Volumina unterhalb 100  $\mu$ l abgegeben werden können. Ein Beispiel für eine derartige Dosiereinrichtung ist ein Mikrodispenser, wie er im folgenden unter Bezug auf die Fign. 1 und 2 erläutert wird.

Fig. 1 zeigt beispielhaft das Ende eines piezoelektrischen Mikrodispensers, der zur Implementierung des erfindungsgemäßen Verfahrens gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung (magnetische Manipulierung des festen Trägermaterials) einge-



richtet ist. Der piezoelektrische Dispenser 1 umfaßt einen elektrischen Wandler 2 und ein Dosier-Reservoir 3, das durch eine Kapillare gebildet wird. Der Wandler 2 ist zur pulsartigen Verringerung des Volumens des Dosier-Reservoirs 3 eingerichtet. Bei Betätigung des Wandlers 2 für eine Pulszeit (typischerweise rd. 40  $\mu$ s) läuft eine Druckwelle durch die Flüssigkeit 4 im Dosier-Reservoir 3. Dies bewirkt einen Flüssigkeitsausstoß am Auslaß 5 (Durchmesser rd. 50  $\mu$ m) des Dosier-Reservoirs 3, der hier durch das Ende der Kapillare gebildet wird (Dispenserspitze). Wenn die Druckwelle in der Flüssigkeit 4 die am Auslaß 5 auftretenden Rückhaltekkräfte (Kapillarkräfte und Oberflächenspannung) überwindet, so kommt es zur Abgabe eines Tropfens 6.

Die Flüssigkeit 4 umfaßt beispielsweise eine Lösung oder Suspension von Probenmolekülen, die bei biochemischen Anwendungen Peptide, Proteine, Nukleinsäuren bzw. DNA-Moleküle, Fette oder Kohlenhydrate umfassen. Um die Probenmoleküle (Substanzprobe) im Dosier-Reservoir 3 erfindungsgemäß aufzukonzentrieren oder aufzureinigen, ist im Dosier-Reservoir 3, vorzugsweise in der Nähe des Auslaß 5, eine Vielzahl magnetischer Partikel 7 angeordnet, die mit einer Antriebseinrichtung zur Halterung und/oder Bewegung der magnetischen Partikel 7 in Form einer Magneteinrichtung 8 manipulierbar sind. Die Magneteinrichtung 8 umfaßt zwei Permanentmagneten 81, 82 mit jeweils veränderlichem Abstand in Bezug auf das Dosier-Reservoir 3 mit den magnetischen Partikeln. Beide Permanentmagneten 81, 82 weisen mit dem gleichen Pol hin zum Reservoir 3. Weitere Einzelheiten der Magneteinrichtung 8 und einer zugehörigen (hier nicht dargestellten) Antriebseinrichtung werden unten unter Bezug auf die Figuren 3 und 4 erläutert.

Die magnetischen Partikel 7 besitzen einen Durchmesser, der etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen kleiner als der Durchmesser der Dispenserdüse (Auslaß 5) ist und vorzugsweise im Bereich

von 0,25 bis 2  $\mu\text{m}$  liegt. Damit wird erreicht, daß die Partikel 7 problemlos als Suspension in den Dispenser 1 eingesaugt und im Dosier-Reservoir 3 deponiert bzw. bewegt werden können. Dies ist sogar in der Nähe des Auslaß 5 möglich, da die magnetische Feldeinwirkung der Magneteinrichtung 8 vorteilhafterweise verhindert, daß Partikel 7 unerwünscht an den Auslaß 5 bzw. aus diesem hinaus gelangen. Ein weiterer Vorteil der angegebenen Partikelgröße besteht darin, daß die deponierten Partikel 7, d.h. die unter der magnetischen Feldkraft an der Dispenserinnenwand haftenden Partikel, aufgrund ihrer geringen Raumausdehnung den piezoelektrischen Dispensiervorgang nicht behindern.

Als magnetische Partikel 7 werden vorzugsweise kommerziell verfügbare Substanzen mit einer genügenden Magnetisierbarkeit und mit einer möglichst großen aktiven Partikeloberfläche verwendet. Die Partikel 7 besitzen eine Affinität für die Probenmoleküle, so daß diese aus der Flüssigkeit 4 heraus im Inneren der Dispenserspitze an die Partikel gebunden werden.

Erfindungsgemäß können die magnetischen Partikel 7 durch Veränderung der magnetischen Feldkräfte in vorbestimmter Weise im Dosier-Reservoir 3 bewegt werden. Die Veränderung der magnetischen Feldkräfte erfolgt durch eine Bewegung des Mikrodispensers 1 und der Magneteinrichtung 8 relativ zueinander, wobei vorzugsweise die Permanentmagneten 81, 82 in Bezug auf die ortsfeste Dispenserspitze bewegt werden. So ist es beispielsweise möglich, durch simultane Entfernung des Magneten 81 und Annäherung des Magneten 82 von der entgegengesetzten Dispenserseite her, die Partikel mit der Probenbeladung durch die Flüssigkeit 4 von einer Wandung des Dosier-Reservoirs 3 zur entgegengesetzten Wandung zu bewegen. Die Partikel 7, die das feste Trägermaterial (Festphase) bilden, werden durch die Flüssigkeit 4 bewegt, von dieser umströmt und mit ihr vermischt, so daß weitere Probenmoleküle gebunden werden, während

andere Lösungsbestandteile in der Flüssigkeit 4 verbleiben. Durch wiederholtes Bewegen der Partikel 7 durch die Flüssigkeit 4 können in ausreichender Menge die interessierenden Probenmoleküle gesammelt werden (Anreicherung). Das gezielte Bewegen der Partikel mit den gebundenen Probensubstanzen durch die Flüssigkeit stellt einen wesentlichen und durch herkömmliche Dispensiersysteme mit großen Flüssigkeitsvolumina nicht erzielbaren Vorteil der Erfindung dar. Erfindungsgemäß sind für die Partikel nicht nur statisch gebundene oder freigegebene Zustände maßgeblich, sondern auch dynamisch gebundene Zustände, in denen das gezielte Bewegen durch die Flüssigkeit erfolgt. Weitere Prozessierungsschritte werden weiter unten erläutert.

Die Permanentmagneten 81, 82 sind vorzugsweise NdFeB-Magneten mit einer anwendungsabhängig gewählten Remanenz. Beim Einsatz mit Mikrodispensern beträgt die Remanenz vorzugsweise rd. 1 Tesla bis 1,5 Tesla.

Fig. 2 zeigt eine zweite Ausführungsform der Erfindung wiederum am Beispiel eines Mikrodispensers 1 mit einem piezoelektrischen Wandler 2 und einem Dosier-Reservoir 3, von dessen Auslaß 5 bei Betätigung des Wandlers 2 ein Mikrotropfen 6 abgegeben werden kann. Als Trägermaterial ist erfindungsgemäß ein Trägerballen 9 vorgesehen, der mit einer Antriebseinrichtung zur Halterung und/oder Bewegung des Ballens 9 in Form eines faden- oder stabförmigen Betätigungselements 91, das durch das Dosier-Reservoir 3 des Dispensers 1 beweglich ist (Pfeilrichtung). Der Trägerballen 9 ist eine zusammenhängende, schwammartige feste Phase, die eine möglichst große aktive Oberfläche besitzt. Das vorzugsweise poröse, an sich jedoch inkompressible Material des Trägerballens 9 besteht beispielsweise aus Nitrocellulose oder einem Säulenfüllmaterial, wie es bei HPLC-Trennungen verwendet wird (z.B. Material "Poros" (registrierte Marke)).

Anstelle der Probensammlung mit den bewegten, magnetischen Partikeln (erste Ausführungsform) wird bei der zweiten Ausführungsform ein mechanisches Wirkprinzip realisiert. Der Trägerballen 9 wird mit dem Betätigungselement 91 durch den Innenraum des Dosier-Reservoir 3 bewegt, um Probenmoleküle aufzusammeln. Der Trägerballen 9 ist von der Flüssigkeit 4 im Mikrodispenser 4 durchströmbar, so daß eine unerwünschte Flüssigkeitsabgabe vermieden wird. Nach dem Anreicherungsverfahren, wenn die aufkonzentrierten Analytmoleküle funktionsgemäß vom Mikrodispenser 1 auf ein bestimmtes Substrat abgegeben werden sollen, wird der Trägerballen 9 durch die Dispenserspitze nach oben durch den Wandler 2 hindurchgezogen.

Zur Verwendung für die erfindungsgemäße Prozessierung von kleinsten Substanzmengen wird eine Dosiereinrichtung durch Aufnahme des festen Trägermaterials in das Reservoir der Dosiereinrichtung vorbereitet. Bei der ersten Ausführungsform erfolgt eine Aufnahme und Deponierung der magnetischen Partikel im Reservoir (z.B. im Dosier-Reservoir des Mikrodispensers), in dem eine Partikelsuspension entweder durch den Auslaß des Reservoirs oder durch eine zusätzliche Versorgungsleitung unter gleichzeitiger Einwirkung der magnetischen Feldkräfte in das Reservoir gefüllt wird. Unter Wirkung der magnetischen Feldkräfte werden die Partikel sofort an eine Reservoirwandung gezogen und dort festgehalten (Deponierung). Bei der zweiten Ausführungsform umfaßt der Vorbereitungsschritt die Zuführung des Trägerballens in das Reservoir der Dosiereinrichtung und eine Fixierung des hierfür verwendeten Betätigungselements derart, daß der Trägerballen im Reservoir nahe dessen Auslaß positioniert ist.

Nach dem Vorbereitungsschritt erfolgt die Aufnahme einer Lösung oder Dispensierung der interessierenden Substanzproben.

Diese Aufnahme erfolgt entsprechend durch einen Auslaß der Dosiereinrichtung oder durch eine zusätzliche Zufuhrleitung.

Beim folgenden Bindungsschritt werden die auf das jeweilige Trägermaterial wirkenden Kräfte derart verändert, daß sich das Trägermaterial durch die aufgenommene Lösung oder Suspension bewegt und dabei von dieser umspült wird, so daß sich eine Bindung der Substanz auf dem Trägermaterial ergibt. Bei der ersten Ausführungsform werden die magnetischen Feldkräfte derart verändert, daß sich die magnetischen Partikel vom ursprünglichen Deponierungsort zu einem anderen Teil der Reservoirwandung (z.B. gegenüberliegende Wandung) bewegen. Bei der zweiten Ausführungsform wird das Antriebselement (z.B. in Fig. 2, Bezugszeichen 91, derart bewegt, daß das Trägermaterial von der Lösung oder Suspension umspült wird. Die Bewegung des Trägermaterials durch die Flüssigkeit erfolgt vorzugsweise periodisch mit einer Vielzahl von Bewegungsabläufen. Die Geschwindigkeit und Dauer der Trägermaterialbewegung und somit des Bindungsschrittes werden anwendungsabhängig gewählt.

Nach Anbindung der interessierenden Substanz am Trägermaterial wird die Flüssigkeit aus dem Reservoir der Dosiereinrichtung durch den Auslaß oder durch eine vom entgegengesetzten (oberen) Ende wegführende Leitung abgegeben. Je nach Anwendungsfall kann nun eine weitere Lösung oder Suspension mit der interessierenden Substanz oder ohne eine Probensubstanz zugeführt werden. Im ersten Fall wird damit eine Anreicherung der Substanz im Reservoir erzielt. Das Aufkonzentrieren erfolgt zunächst im gebundenen Zustand an den Trägermaterialien. Nach wiederholter Zufuhr von Probenlösungen wird dann durch Aufnahme einer geeigneten Elutionslösung in das Reservoir die gebundene Substanz wieder in die Flüssigkeit oder Suspension abgegeben. Nach dem Ablösen der Substanz von den Partikeln oder vom Trägerballen besitzt die Elutionslösung eine höhere Konzentration als die ursprünglich zugeführte Lösung. Im zweiten

Fall kann vorgesehen sein, eine Reinigungslösung zuzuführen, mit der eine vorbestimmte Art von Substanzen, die beim vorherigen Bindungsschritt unbeabsichtigt an den Trägermaterialien angebunden wurden, wieder abgelöst werden. Dies entspricht einer Reinigung oder weiteren selektiven Substanzwahl. Anschließend erfolgt wiederum die Ablösung der Substanz von den Trägermaterialien mit einer geeigneten Elutionslösung.

Mit den vorher beschriebenen Prozessierungsschritten umfassend die Probenbindung und die Proben-Konzentration und/oder Reinigung, können bei geeigneter Wiederholung mit jeweils ausgewählten Substanzen auch mikropräparative und mikrosynthetische Zwecke verfolgt werden. So ist es beispielsweise möglich, zunächst einen ersten Reaktionspartner im Reservoir zu sammeln und/oder zu reinigen, um ihn dann mit einem entsprechend gesammelten und/oder gereinigten zweiten Reaktionspartner zur Reaktion zu bringen. Diese Reaktion kann im gebundenen Zustand auf dem Trägermaterial oder im gelösten oder suspendierten Zustand im Reservoir oder nach Dispensierung auf einem Substrat erfolgen.

Nach der Substanzfreigabe von den Trägermaterialien erfolgt die bestimmungsgemäße Dosierung mit der Dosiereinrichtung durch Abgabe der konzentrierten oder gereinigten Lösung auf ein Ziel-Substrat. Dies erfolgt beispielsweise bei dem beschriebenen Mikrodispenser durch die bestimmungsgemäße Tropfenabgabe durch den Auslaß.

Bei einer erfindungsgemäßen Probensubstanzbehandlung werden beispielsweise Peptide aus einem Volumen der Größenordnung 1 µl bis 2 µl an die Oberfläche magnetischer Partikel gebunden, anschließend mit rd. 10 µl Spülflüssigkeit gereinigt und daraufhin in wenigen 100 nl bis 10 nl eluiert. Von jedem Eluat werden mehrere Analysen mit anwendungsabhängig gewählten Substanzmengen angefertigt. Hierzu werden beispielsweise rd.

0.1 nl bis 1.0 nl pro Analyse auf einen Probenträger dispensiert.

Im folgenden wird eine weitere Ausführungsform der Erfindung mit einer Vielzahl von Dosiereinrichtungen, in denen jeweils Substanzen entsprechend den oben beschriebenen Prinzipien prozessiert werden können, unter Bezug auf die Figuren 3 und 4 beschrieben.

Die Figuren 3 und 4 zeigen schematisch eine Prozessierungsstation für die parallele Bearbeitung einer Vielzahl von Substanzen in Drauf- bzw. Seitenansicht. Die Prozessierungsstation umfaßt eine Dispensereinheit 10 mit einer Vielzahl von Mikrodispensern 1 (z.B. piezoelektrische Dispenser gem. Fig. 1), eine Magneteinheit 20 mit einer Vielzahl von Magneteinrichtungen 8 und eine Antriebseinheit 30, die zur Einstellung der Position bzw. zur Bewegung der Magneteinheit 20 in Bezug auf die Dispensereinheit 10 eingerichtet ist.

Die Mikrodispenser 1 der Dispensereinheit 10 sind als gerade Reihe angeordnet. Die Anzahl und Abstände der Mikrodispenser sind anwendungsabhängig von der Gestalt des jeweiligen makroskopischen Behältnisses gewählt, von dem Proben übernommen werden sollen. Die Anordnung der Mikrodispenser ist vorzugsweise an die Gestalt einer Mikrotiterplatte angepaßt. Bei der dargestellten Ausführungsform sind beispielsweise sechzehn Mikrodispenser 1 entsprechend einer Mikrotiterplatte mit sechzehn reihenweise angeordneten Volumina vorgesehen. Die Mikrodispenser 1 sind an einer (nicht dargestellten) Halterungs- und Stelleinrichtung angebracht.

Die Magneteinheit 20 umfaßt eine Vielzahl von Magneteinrichtungen 8, deren Anzahl mindestens gleich der Anzahl der Mikrodispenser 1 ist. Vorzugsweise wird jedoch an den Enden der

Reihe der Mikrodispenser 1 jeweils eine zusätzliche Magneteinheit zur Schaffung gleichförmiger Feldverhältnisse in den Mikrodispensern an den Enden der Reihe zu schaffen. Jede Magneteinrichtung 8 besteht aus zwei voneinander beabstandeten Permanentmagneten 81, 82, zwischen denen zur Substanzprozessierung jeweils ein Mikrodispenser angeordnet ist.

Die Permanentmagneten 81, 82 sind an den Längsseiten eines die Mikrodispenserreihe umgebenden, sich entsprechend der Dispensereihe länglich erstreckenden Rahmens 21 befestigt. Der Rahmen 21 ist mit der Antriebseinheit 30 in einer Richtung parallel zur Längserstreckung der Mikrodispenser 1 (Auf-/Ab-Bewegung) und in einer zu den Mikrodispensern 1 senkrecht ausgerichteten Bezugsebene (Vor-/Rück-Bewegung) beweglich. Die Längsseiten des Rahmens 21 besitzen einen derartigen Abstand, daß einem Mikrodispenser in einer Position unmittelbar benachbart zu einem der Permanentmagneten 81, 82 die magnetischen Partikel im wesentlichen ausschließlich Feldkräften dieses Permanentmagneten und vernachlässigbar geringen Feldkräften des gegenüberliegenden Permanentmagneten ausgesetzt sind. Außerdem wird der Abstand so gewählt, daß beim Positionswechsel der Mikrodispenser von einem zum gegenüberliegenden Permanentmagneten (Vor-/Rück-Bewegung) die Partikel unter der Wirkung der Schwerkraft dem jeweiligen Reservoir nicht so weit hin zum Auslaß absinken können, daß sie den Kraftwirkungsbe- reich des jeweiligen Permanentmagneten verlassen. Damit wird sichergestellt, daß die Partikel den Auslaß nicht erreichen und dort keine Störungen durch Verstopfen oder dergl. verursachen können.

Der Abstand der Permanentmagnetreihen entlang der Längsseite des Rahmens 21 ist bei der Kombination mit Mikrodispensern kleiner als 1 cm und beträgt vorzugsweise rd. 6 mm bis 7,5 mm.



Die Antriebseinheit 30 umfaßt zwei Servomotoren 31, die über Schwenkhebel 32 mit den Enden des Rahmens 21 verbunden sind. Durch gleichzeitiges Betätigen der Servomotoren 31 ist der Rahmen 21 mit den Schwenkhebeln 32 von einer ersten Position, in der die Dispenserreihe nahe der einen Permanentmagnetenreihe (Permanentmagnete 81) angeordnet ist, in eine zweite Position verschwenkbar, in der die Dispenserreihe nahe der jeweils anderen Permanentmagnetenreihe (Permanentmagneten 82) angeordnet ist. Vorteilhafterweise werden sämtliche Dispenser und sämtliche Permanentmagneten simultan relativ zueinander bewegt. Die Servomotoren sind vorzugsweise zur Bereitstellung verschiedener Schwenkgeschwindigkeiten eingerichtet. Es sind beispielsweise drei Schwenkgeschwindigkeiten vorgesehen, bei denen jeweils unterschiedliche Partikelgeschwindigkeiten im Reservoir jedes Mikrodispensers erzielt werden. Bei den drei Schwenkgeschwindigkeiten benötigt der Positionswechsel von der ersten zur zweiten Position beispielsweise rd. eine viertel Sekunde, eine halbe Sekunde bzw. eineinhalb Sekunden.

Die Antriebseinheit 30 umfaßt ferner zwei Stelleinrichtungen 33, mit denen die Höhenposition der Magneteinrichtungen 8 in Bezug auf die Längsrichtung der Mikrodispenser einstellbar ist. Die Stelleinrichtungen 33 sind vorzugsweise Federaufhängungen mit vorbestimmten Einstellpositionen. Es ist vorzugsweise eine erste Position, in der die Prozessierung in den Mikrodispensern erfolgt, und eine zweite Position vorgesehen, in der die Dispenserenden unterhalb der Ebene des Rahmens 21 hervorragen, um beispielsweise zur Befüllung in ein Gefäß (z.B. in die Volumina einer Mikrotiterplatte) gefahren zu werden. Zur Umstellung von der Prozessierungsposition zur Befüllungsposition werden die Servomotoren 31 mit dem Rahmen 21 zur Freigabe der Dispenserspitzen nach oben gegen Rückholfedern der Stelleinrichtung 33 gedrückt und in der Befüllungsposition verankert. Nach der Befüllung wird die Verankerung freigegeben und die Rückholfedern drücken die Servomotoren 31 mit dem Rah-

men 21 zurück in die Prozessierungsposition. Die Antriebseinheit 30 besitzt ferner eine Motoraufhängung 34, deren Betätigung wiederum mit der Halterungs- und Stelleinrichtung der Dispenserreihe synchronisiert ist.

Bei der Realisierung der oben genannten zweiten Ausführungsform ist die Prozessierungsstation gemäß den Figuren 3 und 4 entsprechend anzupassen. Demnach sind die Trägerballen an einem gemeinsamen Träger reihenweise zu befestigen und mit angepaßten Betätigungselementen in einer Richtung entsprechend der Längsrichtung der Mikrodispenser (Auf-/Ab-Bewegung) zu betätigen.

Die Betätigungselemente besitzen insbesondere für jeden Trägerballen eine Draht- oder Faden-Aufhängung, mit der der Trägerballen vom Auslaß (oder der Düse) des Mikrodispensers bis zu einem oberen Dispenserbereich hochgezogen werden kann. Oberhalb des piezoelektrischen Wandlers kann die Bewegung der Aufhängung magnetisch oder mechanisch erfolgen.

Die erfindungsgemäße Prozessierung geringster Substanzmengen in Mikrodispensern besitzt den Vorteil, daß nur geringe Mengen des Elutionsmittels benötigt werden, um die gebundenen Proben-substanzen in der Dispenserspitze von der festen Phase zu eluieren. Als Elutionsmittel kommen beispielsweise 100 bis 300 nl eines Gemisches aus Acetonitril (80 Vol-%) mit Tri-fluoressigsäure (0.1 Vol-%) zum Einsatz. Die Aufnahme des Elutionsmittels erfolgt durch den Mikrodispenserauslaß (Düse), indem über eine Versorgungsleitung ein Unterdruck (z.B. rd. 10 mbar) am Mikrodispenser erzeugt wird. Über die Einstellung der Oberflächenkräfte bzw. der Kapillarkräfte wird das Elutionsmittel in den Mikrodispenser eingesogen.

Die Implementierung der Erfindung ist nicht auf die oben beschriebenen Ausführungsformen beschränkt. Es sind insbesondere die folgenden Modifikationen möglich. Es ist der Einsatz magnetisch und mechanisch betätigbarer Trägermaterialien simultan möglich. Es ist möglich, anstelle von zwei Permanentmagneten nur einen Permanentmagneten vorzusehen, dessen Position in Bezug auf den jeweiligen Mikrodispenser mit einer Verstelleinrichtung so geändert wird, daß die magnetischen Partikel ständig unter Feldeinfluß bleiben. Es können auch mehr als zwei Permanentmagneten pro Dispenser vorgesehen sein. Anstelle der beschriebenen Mikrodispenser oder Mikropipetten können auch andere Dosiereinrichtungen eingesetzt werden. Es können zusätzliche Mittel zur Formung des Magnetfeldes im Bereich der Reservoirs der Mikrodispenser vorgesehen sein. Anstelle der Permanentmagneten können Elektromagneten oder Magneten auf der Basis von Mikrosupraleitern eingesetzt werden, falls genügend Platz für deren Positionierung gegeben ist. Die oben beschriebenen Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens können wiederholt und modifiziert werden, um bestimmte Prozessierungen zu erzielen.

### PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Prozessieren von Substanzen im Reservoir (3) einer Mikrodosiereinrichtung (1), die zur Mikrotropfenabgabe ausgelegt ist, mit den Schritten:

- Bewegung eines festen Trägermaterials mit einer bindungsaktiven Oberfläche im Reservoir (3), und
- Bindung der Substanz auf der Oberfläche des Trägermaterials.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum Sammeln von Substanzen im Reservoir (3) abwechselnd wiederholt eine Aufnahme einer Lösung oder Suspension der Substanz in das Reservoir und eine Bindung der Substanz an das Trägermaterial erfolgt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem in das Reservoir (3) der Dosiereinrichtung ein Elutionsmittel aufgenommen wird, mit dem die am Trägermaterial gebundene Substanz abgelöst wird.

4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Trägermaterial magnetische Partikel (7) umfaßt, deren Bewegung unter der Einwirkung eines veränderlichen Magnetfeldes erfolgt.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem das veränderliche Magnetfeld durch die simultane Bewegung von Permanentmagneten (81, 82) in Bezug auf das Reservoir (3) gebildet wird.

6. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem das veränderliche Magnetfeld durch Elektromagneten oder Mikrosupraleiter erzeugt wird.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem das Trägermaterial einen Trägerballen (9) umfaßt, dessen Bewegung mit einem mechanischen Betätigungselement erfolgt.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Dosiereinrichtung ein Mikrodispenser (1) oder eine Mikropipette verwendet wird.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche bei dem das Prozessieren der Substanz ein Aufkonzentrieren, Aufreinigen, Präparieren und/oder Synthetisieren umfaßt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem das Reservoir (3) ein Volumen unterhalb von 500 µl besitzt.

11. Vorrichtung zum Prozessieren von Substanzen, die durch eine Mikrodosiereinrichtung (1) mit einem Reservoir (3) gebildet wird, in dem ein Trägermaterial (7, 9) mit bindungsaktiver Oberfläche beweglich angeordnet ist, wobei eine Antriebseinrichtung zur Halterung und/oder Bewegung des Trägermaterials im Reservoir (3) vorgesehen ist und wobei die Dosiereinrichtung (1) zur Mikrotropfenabgabe ausgelegt ist.

12. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, bei der die Mikrodosiereinrichtung eine Mikropipette oder ein Mikrodispenser (1) ist.

13. Vorrichtung gemäß Anspruch 11 oder 12, bei der das Trägermaterial magnetische Partikel (7) umfaßt.

14. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, bei der die Antriebseinrichtung eine Magneteinrichtung (8) umfaßt.

15. Vorrichtung gemäß Anspruch 14, bei der die Magnet-einrichtung (8) mindestens einen Permanentmagneten umfaßt.
16. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, bei der das Trägermaterial einen porösen Trägerballen (9) umfaßt.
17. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16, bei der eine Vielzahl von Mikrodosiereinrichtungen jeweils mit einem Reservoir und eine Antriebseinrichtung mit einer Vielzahl von Magneteinrichtungen (8) oder Trägerballen (9) vorgesehen sind.
18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, bei der die Vielzahl von Mikrodosiereinrichtungen eine Reihe von piezoelektrischen Mikrodispensern umfaßt.
19. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, bei der das Reservoir (3) ein Volumen unterhalb von 500 µl besitzt.

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Zum Prozessieren von Substanzen im Reservoir (3) einer Mikrotropfen-Dosiereinrichtung (1), erfolgt eine Bewegung eines festen Trägermaterials mit einer bindungsaktiven Oberfläche im Reservoir, und eine Bindung der Substanz auf der Oberfläche des Trägermaterials, das magnetische Partikel (7) oder einen Trägerballen umfaßt.

(Fig. 1)

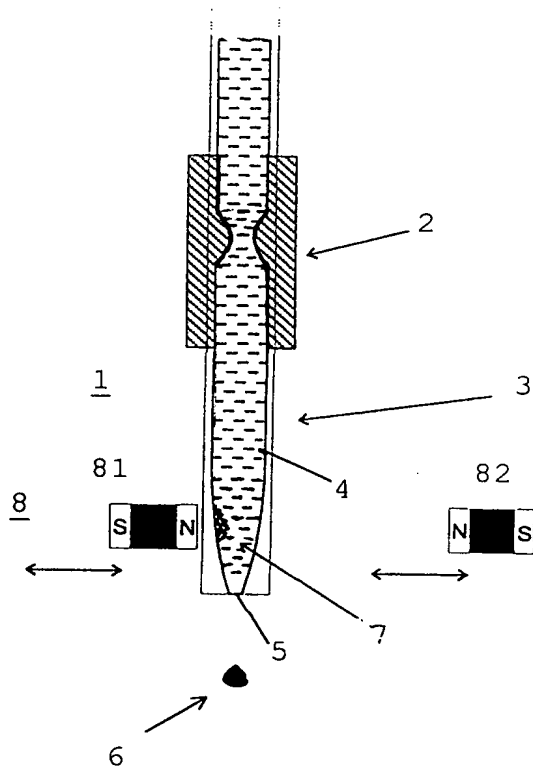


Fig. 1

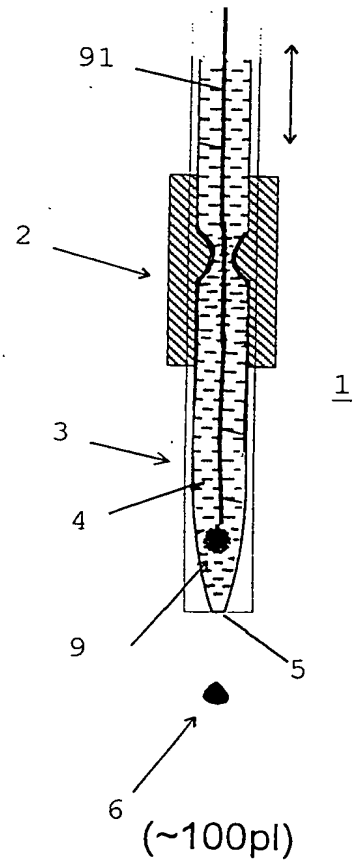


Fig. 2



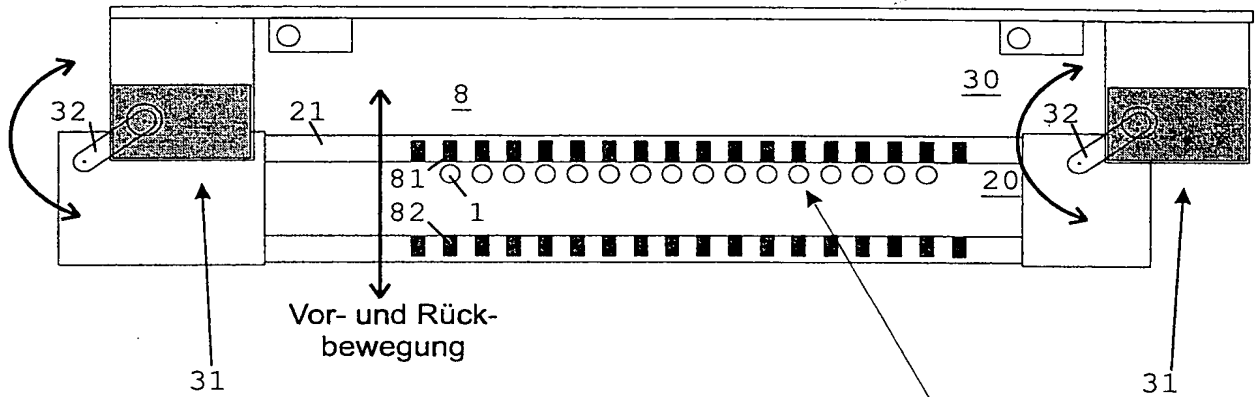


Fig. 3

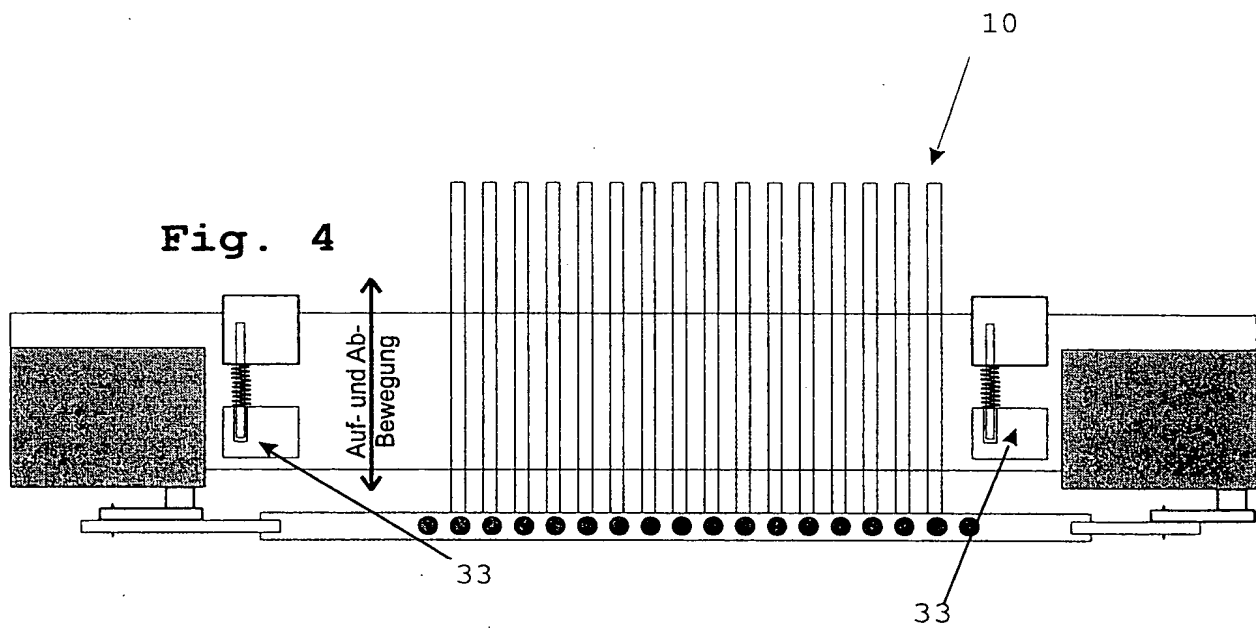


Fig. 4